

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/00024

06.01.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

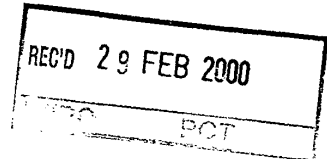
1999年 1月 7日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第001840号

出願人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社



0978699n1

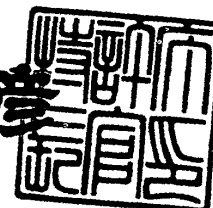
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3004988

【書類名】 特許願

【整理番号】 A98222

【提出日】 平成11年 1月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 活性化蛋白質の製造法

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区向洋町中 1 丁目 1 0 番地 1 0 1 - 2
 0 0 3 号

 【氏名】 伊藤 隆司

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京田辺市田辺勇田 8 0 - 5 0

 【氏名】 田中 葉子

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区木川西 4 丁目 4 番 1 6 - 5 0 7 号

 【氏名】 改正 知子

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県川西市大和西 1 丁目 5 4 番地の 1 6

 【氏名】 西村 紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000002934

 【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

 【代表者】 武田 國男

【代理人】

 【識別番号】 100073955

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】活性化蛋白質の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】精製された配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法。

【請求項 2】銅イオン供給物質が銅、硫酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ぎ酸銅、酢酸銅または硫化銅である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】銅イオン供給物質が硫酸銅である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】活性化されたポリペプチドの有する活性が細胞分化抑制活性である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】精製された配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させることを特徴とする活性型ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は大腸菌を用いた遺伝子組み換え法によるポリペプチドの活性化方法、大腸菌を用いた遺伝子組み換え法による活性型ポリペプチドケモカインの製造方法などに関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

組み換え蛋白（ポリペプチド）の生産にはコスト等の面から大腸菌が最も広く用いられているが、大腸菌で発現を行った場合、封入体を形成したり、正確な S-S 結合が生じないために、蛋白としては得られても活性が認められない場合がある。大腸菌を用いて活性体を得る方法としては、分泌シグナルを付加することによりペリプラズム空間に可溶体として蓄積せしめ、活性体を取得する方法がある（C.N. Changeら、Gene、189-196、55(1987)）。

一方、大腸菌で封入体として発現せしめることは、高い生産量及び封入体では

目的蛋白が高い純度で得られる利点がある。しかし、封入体より活性体を取得するためには、封入体の変成剤による可溶化及び変成剤の除去を含むリフォールディングの過程を必要とする (R.H.Pain編、タンパク質のフォールディング、245-279(1995)、シュプリンガーフェアラーク東京)。このリフォールディングの操作においては、レドックス緩衝液系の使用、尿素やアルギニン塩酸塩等の沈殿防止剤を用いる事により、リフォールディングの効率が高まる事が報告されている。しかしながらこれらの条件は目的とする蛋白 (ポリペプチド) により大きく異なり、一般的なリフォールディング法によっては活性体を得られない場合も多く存在する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

組み換え蛋白 (ポリペプチド) の生産において、より簡便で確実な活性体の取得方法の確立が期待されている。MPIF-1Δ 2 3 (WO 95/17092号) は骨髓幹細胞コロニー形成の阻止作用を有することから、癌化学療法剤から骨髓幹細胞を保護し、抗ガン剤投与時のリミテイングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果が期待される。そのような医薬品として MPIF-1Δ 2 3 を用いる場合には、大量かつ安価に活性型 MPIF-1Δ 2 3 が得られる調製法の確立が必要となる。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、CCケモカインの一種である MPIF (Myeloid Progenitor Inhibitory Factor) -1 Δ 2 3 の活性体を効率よく取得する方法について種々の検討を行った結果、MPIF-1Δ 2 3 を銅処理することによって可能となることを見出した。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 精製された配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法、

(2) 銅イオン供給物質が銅、硫酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ぎ

酸銅、酢酸銅または硫化銅である上記（１）記載の方法、

（３）銅イオン供給物質が硫酸銅である上記（２）記載の方法、

（４）活性化されたポリペプチドの有する活性が細胞分化抑制活性である上記（１）記載の方法、

（５）精製された配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させることを特徴とする活性型ポリペプチドの製造方法などに関する。

【０００６】

【発明の実施の形態】

本発明の活性化方法または活性型ペプチドの製造方法に用いられるポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある）としては、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチドは、遺伝子組換え大腸菌に由来するポリペプチドであってもよく、また合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と約８０％以上、好ましくは約９０％以上、より好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明の活性化方法または製造法において活性化された結果、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列で表されるポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、細胞分化抑制活性（例、骨髓細胞分化抑制活性など）などがあげられる。

実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、細胞分化抑制活性などが同等（例、約０．０１～１００倍、好ましくは約０．５～２０倍、より好ましくは約０．５～２倍）であることが好ましいが、

これらの活性の程度やポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

細胞分化抑制活性（例、骨髄細胞分化抑制活性など）の活性の測定は、自体公知の方法（例えば、J. Exp. Med., 185, 1163-1172(1997)に記載の方法）に準じて行なうことができる。

【0007】

また、本発明のポリペプチドとしては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなども用いられる。

【0008】

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用される

ピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチドには、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどが用いられる。

本発明のポリペプチドは塩を形成していてもよく、本発明のポリペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

以下に本発明のポリペプチドの活性化方法および活性型の本発明のポリペプチドの製造方法について詳述する。

【0009】

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくはは合成

DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0010】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G (宝酒造 (株))、MutantTM-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0011】

ベクターとしては、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカーなどを含有しているものを用いるこ

とができる。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（以下、 Amp^r と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、 Neo と略称する場合がある、 $G418$ 耐性）等があげられる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

【0012】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉

エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5~8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15~43℃で約 3~24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

【0013】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離・精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーな

どの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【 0 0 1 4 】

かくして得られる本発明のポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼなどが用いられる。

【 0 0 1 5 】

抽出したポリペプチドの活性化を行うために、ポリペプチドのリフォールディングを行う。リフォールディングは、例えばタンパク質のフォールディング、R. H. Pain編、245-279(1995)、シュプリンガーフェアラーク東京に記載された公知の方法あるいはそれに準じる方法により実施する事が可能である。抽出剤（例えば、グアニジン塩酸塩、尿素のようなカオトロピック可溶化剤、n-ラウリルメチルグリシン、SDSのような界面活性剤など）を含まないもしくは低濃度の抽出剤を含む緩衝液で1段階もしくは他段階で希釈すること、半透膜を用いた透析、ゲル濾過を用いた緩衝液の置換等により行うことが出来る。この場合、ポリペプチドのアグリゲーションを防止するために、アルギニン、ポリエチレングリコール、中性界面活性剤等を添加することが出来る。ポリペプチドのジスルフィド結合形成のために空気酸化、酸化還元緩衝液系等を用いることが出来る。酸化還元緩衝液にはグルタチオン、システイン、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、またはシステアミンをベースとしたものが挙げられる。

本発明のポリペプチドは例えば、（１）上記の分離・精製後に、（２）リフォールディングの後に、（３）リフォールディングと同時に、または（５）ポリペプ

チドを菌体から抽出した後に、銅イオンまたは銅イオン供給物質と接触させる。

本明細書において「精製された本発明のポリペプチド」は上記の分離・精製法で精製された本発明のポリペプチド（純度：50%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）に加えて、組換え体菌体から得られた粗抽出液や培養上清、上記の分離・精製法で得られた部分精製品も含む。

リフォールディング時に銅イオンまたは銅イオン供給物質（例、銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ギ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等）とポリペプチドを接触させる方法としては、例えば、銅イオンまたは銅イオン供給物質を抽出液またはリフォールディング緩衝液に添加すること、または抽出液およびリフォールディング緩衝液の両者に添加することによって行うことが出来る。用いる抽出液のpHは4~10好ましくは6~9さらに好ましくは7~9である。リフォールディング液のpHは3~10好ましくは3~8さらに好ましくは4~6である。銅イオンまたは銅イオン供給物質としては、例えば硫酸銅の場合では、0.1~10000 μM 好ましくは1~1000 μM さらに好ましくは1~100 μM の濃度で抽出液またはリフォールディング緩衝液添加する、もしくは抽出液およびリフォールディング緩衝液の両者に添加する。抽出を行う条件は、0~37℃で1~96時間、リフォールディングの条件としては、0~37℃で1~96時間がある。

【0016】

またリフォールディングの前あるいは後に本発明のポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させてもよい。精製後に、銅イオンまたは銅イオン供給物質（銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ギ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等）と本発明のポリペプチドとを接触させる方法としては、例えば、精製後の本発明のポリペプチドを銅イオンまたは銅イオン供給物質を含有する溶液（例えば、ピリジン溶液、酢酸緩衝液、トリスヒドロキシメタン緩衝液、リン酸緩衝液など）中に、蛋白濃度として0.01~50 mg/mL、好ましくは0.1~20 mg/mLさらに好ましくは1~10 mg/mLで混合または溶解し、0~37℃で0.1~24時間活性化を行う。銅イオンまたは銅イオン供給物質としては、例えば硫酸銅の場合では、0.01~1000 mM 好ましくは0.1~100 mM さらに好ましくは0.1~10 mM

の濃度で添加する。

さらに、精製後の本発明のポリペプチドをEP0812856号に記載の方法に準じてN末端のメチオニンを除去する工程において、銅イオンまたは銅イオン供給物質（銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蓚酸銅、塩化銅、ぎ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等）と接触させ、N末端のメチオニンが除去された活性化された本発明のポリペプチドを得ることもできる。

【0017】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0018】

Gly	: グリシン
-----	--------

A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン

【 0 0 1 9 】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号： 1〕

本発明のMPIF-1Δ23のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 2〕

参考例 1 で用いられたプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 3〕

参考例 1 で用いられたプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4〕

参考例 1 で用いられたプライマー 3 の塩基配列を示す。

【0020】

後述の参考例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) MM294 (DE3) / pTCIID23-MPIF1は、平成10年11月24日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6582として、平成10年10月27日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号 IFO 16212として寄託されている。

【0021】

【実施例】

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0022】

参考例1 MPIF-1Δ23発現株の構築

成熟体MPIF-1の構造遺伝子を、ヒト肝臓cDNAライブラリー (Quick-Clone, CLO NTECH社製) より、構造遺伝子上流に隣接してNde I切断部位及び開始コドンを持つプライマー1 (5'-CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG; 配列番号: 2)、及び終始コドン下流に隣接してBam HI切断部位を持つプライマー2 (5'-CATATGGGACAGATTCCATGCTACTAGTGCTGA; 配列番号: 3) を用いて、PCRで増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA original cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いてpCR2.1ベクターに連結し、pCR2.1/MPIF-1を作製した。これを大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性とβ-ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/MPIF-1を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製) を用いてpCR2.1/MPIF-1を調製した。

成熟体MPIF-1のN末端23個のアミノ酸を欠失させたMPIF-1Δ23の構造遺伝子はpCR2.1/MPIF-1よりPCRによって取得した。成熟体MPIF-1の24番目のAspをコードする遺伝子上流に隣接してNde I切断部位及び開始コドンを持つプライマー3 (5'-CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG; 配列番号: 4) 及びプライマー2を用いてPCRによりMPIF-1Δ23の構造遺伝子を増幅した。PCRにより増幅した遺伝

子を、TA original cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いて pCR2.1 ベクターに連結し、pCR2.1/ d23-MPIF1 を作製した。これを大腸菌 JM109 に導入し、アンピシリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/ d23-MPIF1 を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製) を用いて pCR2.1/ d23-MPIF1 を調製した。

MPIF-1 Δ 23 の発現プラスミドは以下のように構築した。pBR322 を Nde I で切断、T4 DNA ポリメラーゼ (DNA Blunting kit, 宝酒造株式会社製) で末端を平滑化し、再度連結する事によって、Nde I 認識部位を欠損させた pBRdesNde を作製した。pET3c を Bgl II - Eco RV で切断し、約 0.26 kbp の断片を回収した後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNde の Sca I 断片と連結して、pBR/T7 desNde を作製した。また、部位特異的変異導入 (Quick Change, STRATAGENE 社製) により、pBR322 の Bam HI 認識部位を欠損させた pBR322desBam を作製した。pBR322desBam の Sph I - Eco RV 断片を pBR/T7 desNde の Sph I - Eco RV 断片と連結して、テトラサイクリン耐性発現ベクター pTCII を作製した。pCR2.1/ d23-MPIF1 を Nde I 及び Bam HI で切断してアガロース電気泳動を行い、約 240 bp の MPIF-1 Δ 23 構造遺伝子を QIAquick Spin Purification Kit (キアゲン社製) を用いて回収した。発現ベクター pTCII を Nde I 及び Bam HI で切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約 4.6 kbp のバンドを回収した。MPIF-1 Δ 23 構造遺伝子を発現ベクター pTCII の Nde I - Bam HI 断片と連結した後、大腸菌 JM109 に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミド pTCII/ d23-MPIF1 とした。

この pTCII/ d23-MPIF1 を大腸菌 MM294 (DE3) に導入して、テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、MPIF-1 Δ 23 発現株 MM294 (DE3)/ pTCII d23-MPIF1 を取得した。

【 0 0 2 3 】

参考例 2 MPIF-1 Δ 23 発現株の培養

参考例 1 で得られた MPIF-1 Δ 23 発現株 MM294 (DE3)/ pTCII d23-MPIF1 を 10 mg/L のテトラサイクリンを含む LB 培地 (1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) 1 リットルで 30℃ 16 時間培養した。得られた培養液を 20 リットルの主発酵用

培地 (1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.0%カザミノ酸、1.0%イーストエキス) を仕込んだ50L容発酵槽に移植して、37℃、通気量 16 L/min、攪拌回転数 200 rpm で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1300クレット単位になった時点で、5.95 mg/L 分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。IPTG添加後24分、130分及び200分後に0.75%のグルコースを添加し培養開始9.5時間後まで培養を行った。培養液を12000 rpmで約300 mL/minで連続遠心分離を行い、菌体620 g を得た。

【0024】

参考例 3 MPIF-1Δ23の精製

参考例 2 で得られた菌体 65 g に65 mLの25 mM EDTA を含む0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)を加えて懸濁し、ソニファイアー (ブランソン社製) を用いて連続超音波破碎を行い菌体を破碎した。菌体破碎液を、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行い、上清を廃棄し、封入体を得た。この封入体に25 mM EDTA 及び 3M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl (pH7.5)を130 mL加え、封入体を溶解し、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行った。得られた上清液 130 mLに2 mM EDTA 及び0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 1.3 Lを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行い、遠心上清液 60 Lを得た。この遠心上清液を50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したヘパリントヨパールカラム (2.6 cm x 26 cm、東ソー社) に毎分20 mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、毎分8 mLの流速で1 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、分画分子量1000の透析膜を用いて50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) に対して4℃で一晩透析を行い、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化したTSKgel SP-5PWカラム (2.15 cm x 15 cm、東ソー社) に添加した。MPIF-1Δ23が吸着したTSKgel SP-5PWカラムを、1.5 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、セントリプレッブ 3 (分画分子量3000、アミコン社) を用いて限外濾過濃縮を行った。濃縮液

を150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephacryl S100HRカラム (4.4 cm x 47.3 cm、アマシャムファルマシア バイオテック社) によりゲル濾過を行い、MPIF-1Δ23精製品149 mgを得た。この MPIF-1Δ23のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果を図1に示す。MPIF-1Δ23 精製品を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解 を行い、アミノ酸分析計 (日立L-8500 AAmino Acid Analyzer) を用いて アミノ酸組成を決定した。その結果、表1に示されるようにcDNA塩基配列から予 想されるアミノ酸組成と一致した。

【表1】

参考例3で調製したMPIF-1Δ23のアミノ酸組成

amino acid	MPIF-1Δ23 理論値	測定値
Asx	7	6.8
Thr	6	6.0
Ser	8	7.4
Glx	5	5.0
Pro	4	3.8
Gly	2	2.0
Ala	3	3.0
Val	3	2.8
Met	3	2.9
Ile	4	3.7
Leu	5	5.1
Tyr	2	2.0
Phe	4	3.8
Lys	7	6.7
His	1	1.0
Arg	7	6.9

Ser, Thrは0hrに外挿
他は24, 48hr平均値

さらに、N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アプライドバイオ システムズ モデル477A) を用いて決定した。その結果、表2に示されるよ うにcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した。

【表 2】

参考例 3 で調製した MPIF-1 Δ 23 の N 末端アミノ酸配列

残基No.	検出された PTH* アミノ酸 (pmol)	MPIF-1 Δ 23 の配列
1	Met (426)	Met
2	Asp (379)	Asp
3	Arg (209)	Arg
4	Phe (340)	Phe
5	His (121)	His
6	Ala (284)	Ala
7	Thr (117)	Thr
8	Ser (78)	Ser
9	Ala (144)	Ala
10	Asp (84)	Asp

PTH*: フェニールチオヒダントイン
1nmol を用いて分析を行った。

【 0 0 2 5 】

実施例 1 MPIF-1 Δ 23 不活性体の硫酸銅処理による活性化

参考例 3 で取得した MPIF-1 Δ 23 を 0.1、0.5、1、5 及び 10 mM 硫酸銅を含む 1.0M ピリジン緩衝液 (pH 5.9) に 0.5 mg/mL になるように加え、室温で 1 時間処理を行った後、150 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した NAP-5 カラム (アマシャムファルマシアバイオテック社) により緩衝液の置換を行った。活性化前及び後の MPIF-1 Δ 23 のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定を以下に記載した方法により行った。5 ~ 12 週令の C57BL/6 マウス (♀) をドライアイスで窒息死させた後、大腿骨を取り出し、25G の注射針を用いて 10% FBS-IMDM をフラッシュすることにより骨髄より骨髄細胞を取り出した。予め 4 mL のヒストパック 1119 を加えた 15 mL 容の遠心チューブに骨髄細胞懸濁液を静かに重層し、遠心分離 (750 g、30 分間) を行い細胞を集めた。中間層の細胞を集め、10% FBS-IMDM で 2 回洗浄した後、10 mL の 10% FBS-IMDM に懸濁した後、10 cm Φ の細胞培養用シャーレに播種し、37℃、5% CO₂ 下で 2 時間静置した。骨髄細胞以外の細胞を接着させたシャーレを軽く揺すった後、培養液を遠心管に移し、遠心分離 (1000 rpm、5 分間) を行い細胞を集めた。細胞を 44,000 cells/mL になるように 10% FBS-IMDM に懸濁し、マウス IL-1α (ジェンザイム社製) 2.5 ng/mL、マウス IL-3 (アップステートバイオテクノロジー社製) 2.5 ng/mL、マウス SCF (ジ

エンザイム社製) 10 ng/mL、ヒトM-CSF (ジェンザイム社製) 10 ng/mL及び MPIF-1Δ23を含む完全メチルセルロース培地メトカルト (ベリタス社製) 中で37℃、5% CO₂、7% O₂下で7日間培養した。培養後の各ウェルを顕微鏡下で観察し、コロニーの直径が0.5 mm未満のものをLPP-CFCとして、ウェル中のLPPの数を測定した。MPIF-1Δ23無添加時のLPP-CFCコロニー数を100%としてMPIF-1Δ23添加時のコロニー形成抑制の割合を%で示した。測定結果を図2に示した。参考例3において取得したMPIF-1Δ23を添加した場合のLPP-CFCコロニー形成抑制は0.1 ng/mLで-1%、1.0 ng/mLで22%で、コロニー形成抑制作用がほとんど認められないのに対して、1 mMの硫酸銅で処理を行った場合に最も高い活性が認められ、0.1 ng/mLで44%、1 ng/mLで52%とLPP-CFCコロニーの形成を抑制した。

【0026】

実施例2 MPIF-1Δ23 不活性体のN末端アミノ酸除去処理による活性化
参考例3で取得した MPIF-1Δ23 25 mg を0.15Mグリオキシル酸及び5 mM硫酸銅を含む1.0Mピリジン緩衝液 (pH 5.9) 25 mLに加え、室温で1時間処理を行った後、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephadex G-25カラム (3.2 x 45 cm、アマシャムファルマシアバイオテク社) により緩衝液の置換を行った。Sephadex G-25の溶出液 60 mLに酢酸ナトリウム、ギ酸及びフェニレン-1、2-ジアミンをそれぞれ2 M、2 M及び40mMになるように加え、37℃で15時間反応を行った。反応終了後、YM-3限外濾過膜 (アミコン社) で約50mLまで濃縮し、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephadex G-25カラム (3.2 x 45 cm、アマシャムファルマシアバイオテク社) により緩衝液の置換を行った。Sephadex G-25の溶出液 60 mLを150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化したT S K g e l CM-5PWカラム (2.15 x 15 cm、東ソー社) に吸着させ、1.5Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、セントリプレップ3 (分画分子量3000、アミコン社) を用いて、液量が約 3 mLになるまで、限外濾過濃縮を行った。濃縮液を150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 75カラム (2.6 cm x 60 cm、アマシャムファルマシアバ

イオテク社)によりゲル濾過を行い、N末端メチオニンを除去したMPIF-1 Δ 23 (Des-Met MPIF-1 Δ 23) 精製品 8.5 mgを得た。Des-Met MPIF-1 Δ 23精製品を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計(日立L-8500AAmino Acid Analyzer)を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、表3に示されるとおり、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。

【表3】

実施例2で調製したDes-Met MPIF-1 Δ 23のアミノ酸組成

amino acid	MPIF-1 Δ 23 理論値	測定値
Asx	7	7.2
Thr	6	5.4
Ser	8	8.3
Glx	5	5.0
Pro	4	3.6
Gly	2	2.1
Ala	3	2.9
Val	3	3.0
Met	3	2.0
Ile	4	3.7
Leu	5	5.2
Tyr	2	2.0
Phe	4	3.9
Lys	7	6.9
His	1	1.1
Arg	7	6.8

Ser、Thrは0hrに外挿
他は24, 48hr平均値

さらに、N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(アプライドバイオシステムズ モデル477A)を用いて決定した。その結果、表4に示されるとおり、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した。

【表 4】

実施例 2 で調製した Des-Met MPIF-1 Δ23 の N 末端アミノ酸配列

残基No.	検出された PTH* アミノ酸 (pmol)	MPIF-1 Δ23 の配列
1	Asp(272)	Met
2	Arg(238)	Asp
3	Phe(390)	Arg
4	His(81)	Phe
5	Ala(193)	His
6	Thr(71)	Ala
7	Ser(49)	Thr
8	Ala(55)	Ser
9	Asp(51)	Ala
10	-	Asp

PTH*: フェニールチオヒダントイン
1nmol を用いて分析を行った。

両分析により、N 末端のメチオニンが除去されているのを確認した。このマウス骨髓細胞分化抑制作用の測定を測定した結果を、図 3 に示した。上記方法により調製した Des-Met MPIF-1 Δ23 は参考例 3 で取得した活性化処理前の MPIF-1 Δ23 より高い活性を示した。

また、以下の方法によりカルシウムイオンの細胞内動員活性についても測定を行った。THP-1 細胞 (ATCC、TIB-202) を 5×10^6 細胞/mL になるように 1mM 塩化カルシウムを含む MG 緩衝液 (Modified Gey's Buffer) に懸濁し、蛍光指示薬 Fura PE3/AM (和光純薬社) を $2 \mu\text{M}$ になるように加え、 37°C で 30 分間保持した。細胞を MB 緩衝液で洗浄した後、1mM 塩化カルシウムを含む MG 緩衝液で 2.5×10^6 細胞/mL になるように懸濁し、96 穴プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注し、参考例 3 において取得した MPIF-1 Δ23 及び上記で取得した Des-Met MPIF-1 Δ23 を添加し、フルオレッセンスドラッグスクリーニングシステム (浜松ホトニクス社) を用いて細胞内カルシウム濃度の変化量を測定した。この結果を図 4 に示す。上記方法により取得した Des-Met MPIF-1 Δ23 では参考例 3 で取得した活性化処理前の MPIF-1 Δ23 に比べ高い活性が認められた。

【0027】

【発明の効果】

本発明の活性化方法または製造法は、癌化学療法剤から骨髓幹細胞を保護し、抗

ガン剤投与時のリミテイングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果を有する活性型MPIF-1Δ 2 3 を、大量かつ安価に製造することを可能にする。

【 0 0 2 8 】

【配列表】

【配列番号： 1 】

配列の長さ： 7 7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met	Asp	Arg	Phe	His	Ala	Thr	Ser	Ala	Asp	Cys	Cys	Ile	Ser	Tyr	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Ser	Ile	Pro	Cys	Ser	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Phe	Glu	Thr	Asn
				20					25					30	
Ser	Glu	Cys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg
				35				40						45	
Arg	Phe	Cys	Ala	Asn	Pro	Ser	Asp	Lys	Gln	Val	Gln	Val	Cys	Met	Arg
				50				55						60	
Met	Leu	Lys	Leu	Asp	Thr	Arg	Ile	Lys	Thr	Arg	Lys	Asn			
65						70						75			

【 0 0 2 9 】

【配列番号： 2 】

配列の長さ： 3 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： 合成DNA

配列

CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG

33

【 0 0 3 0 】

【配列番号： 3】

配列の長さ： 3 3

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 合成DNA

配列

CATATGGGAC AGATTCCATG CTA TAGTGC TGA

33

【 0 0 3 1 】

【配列番号： 4】

配列の長さ： 3 3

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 合成DNA

配列

CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG

33

【 0 0 3 2 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 参考例 2 で調製したMPIF- 1 Δ 2 3 の SDS-PAGE の結果を示す電気泳動図を示す。

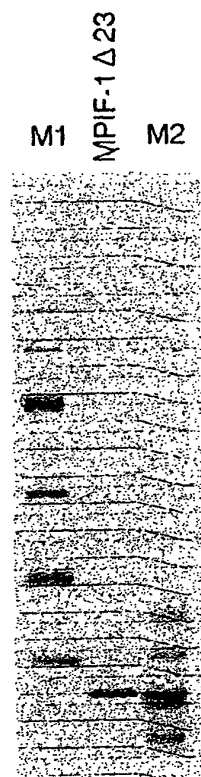
【図 2】 実施例 1 で行われた硫酸銅処理によるMPIF- 1 Δ 2 3 の活性化を示す図を示す。

【図 3】 実施例 2 で行われたDes-Met MPIF- 1 Δ 2 3 のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定結果を示す図を示す。

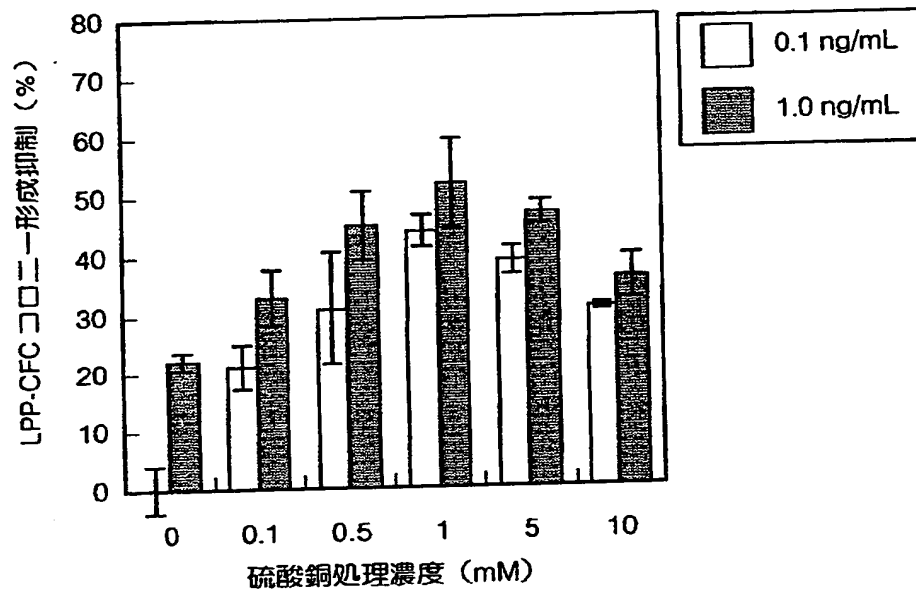
【図 4】 実施例 2 で行われたDes-Met MPIF- 1 Δ 2 3 の細胞内カルシウム濃度の変化量を示す図を示す。

【書類名】 図面

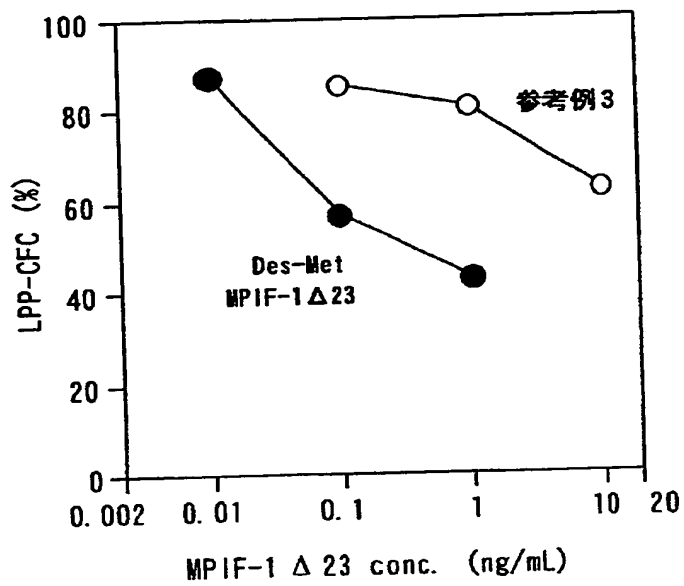
【図 1】



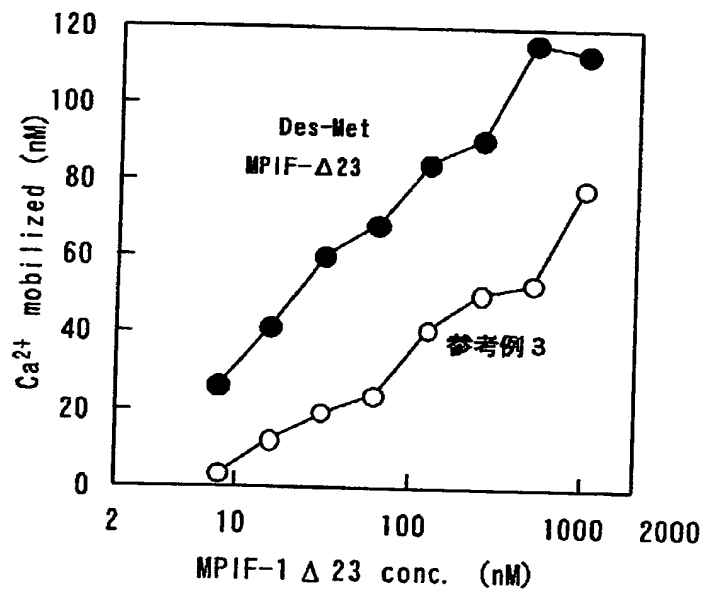
【図 2】



【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた活性化蛋白質の製造法の提供。

【解決手段】

精製された配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオンまたは銅イオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法。

【効果】 本発明の活性化方法または製造法は、癌化学療法剤から骨髓幹細胞を保護し、抗ガン剤投与時のリミティングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果を有する活性型MPIF-1Δ23を、大量かつ安価に製造することを可能にする。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社